

**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<b>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>7</sup> :</b> C12N 9/64, C07K 16/40, A61K 38/48, 48/00, 39/395, G01N 33/53, C12Q 1/68, C12N 5/10		<b>A2</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/43505</b>  <b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b> 27. Juli 2000 (27.07.00)
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/EP00/00390 <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 19. Januar 2000 (19.01.00)  <b>(30) Prioritätsdaten:</b> 199 02 550.9 22. Januar 1999 (22.01.99) DE 199 25 946.1 8. Juni 1999 (08.06.99) DE 199 29 115.2 24. Juni 1999 (24.06.99) DE  <b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> MEMO- REC MEDICAL MOLECULAR RESEARCH COLOGNE STOFFEL GMBH [DE/DE]; Stöckheimer Weg 1, D-50829 Köln (DE).  <b>(71)(72) Anmelder und Erfinder:</b> HOFMANN, Kay [DE/DE]; Ehrenfeldgürtel 139, D-50823 Köln (DE).  <b>(74) Anwälte:</b> MEYERS, Hans-Wilhelm usw.; Von Kreisler Selting Werner, Postfach 10 22 41, D-50462 Köln (DE).		<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  <b>Veröffentlicht</b> <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	
<b>(54) Title:</b> PROTEASE  <b>(54) Bezeichnung:</b> PROTEASE  <b>(57) Abstract</b>  The invention relates to protease with two aspartate radicals in a catalytically active structure, a first aspartate radical being in a sequence X <sub>1</sub> GX <sub>2</sub> GD and a second aspartate radical being in a sequence X <sub>3</sub> X <sub>4</sub> DX <sub>5</sub> , X <sub>1</sub> , X <sub>2</sub> , X <sub>3</sub> and X <sub>5</sub> being selected independently of each other from the following: Ala, Val, Leu, Met and Ile; and X <sub>4</sub> being an aromatic amino acid. The sequences X <sub>1</sub> GX <sub>2</sub> GD and X <sub>3</sub> X <sub>4</sub> DX <sub>5</sub> lie in a transmembrane region.  <b>(57) Zusammenfassung</b>  Protease mit zwei Aspartatresten in einer katalytisch aktiven Struktur, wobei ein erster Aspartatrest in einem Motiv X <sub>1</sub> GX <sub>2</sub> GD liegt und ein zweiter Aspartatrest in einem Motiv X <sub>3</sub> X <sub>4</sub> DX <sub>5</sub> liegt, wobei X <sub>1</sub> , X <sub>2</sub> , X <sub>3</sub> und X <sub>5</sub> unabhängig voneinander ausgewählt werden aus Ala, Val, Leu, Met und Ile und X <sub>4</sub> eine aromatische Aminosäure ist, und die Motive X <sub>1</sub> GX <sub>2</sub> GD und X <sub>3</sub> X <sub>4</sub> DX <sub>5</sub> ? in einer Transmembranregion liegen.			

# **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

## Protease

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind eine Protease, Nucleinsäuren kodierend für die Protease sowie die damit in Verbindung stehenden Inhibitoren, Antikörper, Arznei- und Diagnostikmittel.

Die vorliegende Erfindung stellt eine Protease mit zwei Aspartatresten in einer katalytisch aktiven Struktur, wobei ein erster Aspartatrest in einem Motiv  $X_1GX_2GD$  liegt und ein zweiter Aspartatrest in einem Motiv  $X_3X_4DX_5$  liegt, wobei  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$  und  $X_5$  unabhängig voneinander ausgewählt werden aus Ala, Val, Leu, Met und Ile und  $X_4$  eine aromatische Aminosäure ist, und die Motive  $X_1GX_2GD$  und  $X_3X_4DX_5$  in einer Transmembranregion liegen, zur Verfügung. Für die Motive wurde der Einbuchstabencode der Aminosäuren verwendet, d.h. D = Asp, G = Gly usw.

Solche Proteasen sind mit hoher Wahrscheinlichkeit an der Spaltung des Amyloid Precursor Proteins (APP) beteiligt. In einer Ausführungsform der Erfindung stellt die erfindungsgemäße Protease die bisher nicht identifizierte  $\gamma$ -Secretase dar, die an der Prozessierung des APP zu den als A $\beta$  bezeichneten Amyloidpeptiden beteiligt ist.

Ein Überblick über die Rolle der  $\gamma$ -Secretasen bei der Entstehung der Alzheimerschen Erkrankung geben S.L. Ross et al. in J. of Biol. Chem. 273 (1998), 15309-15312.

Bevorzugte Proteasen der vorliegenden Erfindung weisen zusätzlich eine Sequenz  $PALX_6YX_7V$  auf, wobei  $X_6$  und  $X_7$  unabhängig voneinander die gleiche Bedeutung haben wie  $X_1$ . Es wird jedoch bevorzugt, dass  $X_6$  und  $X_7$  Leucin oder Isoleucin sind.

Insbesondere handelt es sich bei den Proteasen um Proteasen von Säugtieren, insbesondere von Menschen.

Die erfindungsgemäßen Proteasen weisen bevorzugt katalytisch aktive Aspartatreste in einer Region auf, die innerhalb eines Transmembranbereichs liegt. Transmembranbereiche lassen sich bei Kenntnis der Sequenz eines Proteins aufgrund verschiedener Modelle vorhersagen. Sie sind dadurch gekennzeichnet, dass in einem Bereich überwiegend hydrophobe Aminosäuren liegen, die von Bereichen flankiert werden, in denen eher hydrophile Aminosäuren liegen.

Ein Aspartat in einer Transmembranregion lässt sich beispielsweise durch Anwendung des Programms „GREASE“ nachweisen, das Teil des FASTA 2.0 Programmpaketes ist. Bei einer Fensterbreite von 17 muss mit Hilfe dieses Programms ein Hydrophobizitätswert von mindestens 80 für das Aspartat berechnet werden. Das FASTA-Programmpaket ist beschrieben in W. R. Pearson and D. J. Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85 (1988) 2444-2448. Das Programm GREASE benutzt den Kyte/Doolittle Algorithmus, beschrieben in J. Kyte and R. F. Doolittle, J. Mol. Biol. 157 (1982) 105-132.

Besonders bevorzugte Proteasen der vorliegenden Erfindung werden als psl 1 - 5 bezeichnet (humane psl 1 - 5: SEQ ID No. 1 bis 4 + 19, murine psl 2 - 4: SEQ ID No. 5 - 7, sacc. cerevisiae psl 3: SEQ ID No. 8, humane psl2L SEQ ID No. 18).

Weiterhin sind Varianten der erfindungsgemäßen Proteasen Gegenstand der Erfindung. Varianten sind Proteine, die durch einen oder mehrere Mutationen, Insertionen und Deletionen, insbesondere durch konservative Austausche, von den erfindungsgemäßen Proteasen abgeleitet sind, ins-

besondere N- oder C-terminal verkürzte oder verlängerte Formen.

Auch Nucleinsäuren, die für die erfindungsgemäßen Proteasen kodieren, sind Gegenstand der Erfindung. Bevorzugte erfindungsgemäße Nucleinsäuren sind solche mit der SEQ ID No. 9 - 17 + 20 (human psl 1 - 5: SEQ ID No. 9 - 12 + 20, murine psl 2 - 4: SEQ ID No. 13 - 15, *sacc. cerevisiae* psl 3: SEQ ID No. 16, humane psl2L SEQ ID No. 17). Auch komplementäre Nucleinsäuren sind Bestandteil der Erfindung.

Die erfindungsgemäßen Proteasen sind an der Spaltung des APP zum A $\beta$  beteiligt und sind damit indirekt an der Entstehung beispielsweise der Alzheimerschen Erkrankung beteiligt. Daher sind auch Inhibitoren, die die Expression oder die Aktivität der Proteasen hemmen, Gegenstand der Erfindung. Solche Inhibitoren können in einfachen Verfahren identifiziert werden. Entsprechende Inhibitoren können beispielsweise durch Messung der Expression oder der Aktivität der Proteasen in Gegenwart von potentiellen Inhibitoren identifiziert werden. Insbesondere zur Messung der Expression eignen sich gegen die Aspartatproteasen gerichtete Antikörper, die somit ebenfalls Bestandteil der Erfindung sind.

Die erfindungsgemäßen Aspartatproteasen sind auch an der Spaltung anderer Transmembranproteine beteiligt, insbesondere des Rezeptorprotein *Notch* und verwandter Proteine, die in der Entwicklung des Nervensystems eine Rolle spielen.

Die proteolytische Spaltungen im Inneren von Membranen ist auch an anderen wichtigen Prozessen beteiligt, z.B.:

- Proteolytischer Abbau von N-terminalen Signalpeptiden nach deren Abspaltung durch die Signalpeptidase.

- Proteolytischer Abbau von C-terminalen Propeptiden, wie sie durch transamidase-katalysierte Abspaltung bei der posttranslationalen GPI-Verankerung von Proteinen entstehen.
- Generierung von Peptiden für die Präsentation durch Histokompatibilitäts-Komplex Moleküle vom Typ I und II. Bei löslichen Proteinen werden solch Peptide vornehmlich durch das Proteasom gebildet. Es entstehen jedoch auch Peptide aus Transmembranregionen von Proteinen, wie sie nur durch eine Spaltung im Inneren der Membran erklärt werden können.
- Proteolytische Spaltung des ER-Stress Sensorproteins Ire1. Das endoplasmatische Retikulum besitzt einen Mechanismus, der die Akkumulation von nicht-gefalteten oder falsch-gefalteten Proteinen detektiert und ein Signal in den Zellkern sendet. Dieser Mechanismus wird "Unfolded Protein Response" oder UPR genannt, und führt zur vermehrten Bildung von Proteinen, die die Faltung erleichtern. Im Säuger gibt es zwei Sensor-Proteine (Ire1alpha und Ire1beta), die auf Faltungsdefekte reagieren und dann innerhalb der Membran proteolytisch gespalten werden.

Durch Einsatz der erfindungsgemäßen Protease bzw. deren Inhibitoren lassen sich die genannten Prozesse therapeutisch beeinflussen.

Hierfür eignen sich insbesondere Zell-Linien, die keine der erfindungsgemäßen Proteasen oder Nukleinsäuren exprimieren und bevorzugt auch keine homologen Proteasen oder Nukleinsäuren enthalten. Mit diesen läßt sich bevorzugt gemäß dem in Beispiel 1 beschriebenen Verfahren die Aktivität der Proteasen testen bzw. Inhibitoren gemäß dem Beispiel 2 ermitteln. Besonders geeignet hierfür ist *Saccharomyces cerevisiae*. In

Kenntnis der entsprechenden Protease bzw. der kodierenden Nukleinsäure (SEQ ID No. 8 und 16) lassen sich nach bekannten Methoden Hefestämme herstellen, die dieses Protein bzw. die Nukleinsäure nicht mehr enthalten. Sie eignen sich daher bevorzugt als Expressionssystem zur Charakterisierung der erfindungsgemäßen Aspartatproteasen bzw. zur Identifizierung von geeigneten Inhibitoren. Entsprechende Zelllinien, bevorzugt Hefezell-Linien sowie die Verwendung des Proteins mit der SEQ ID No. 8 als Aspartatprotease und der Nukleinsäure mit der SEQ ID No. 16 zur Expression einer Protease sind daher ebenfalls Gegenstand der Erfindung.

Die erfindungsgemäßen Proteasen, Nucleinsäuren, Inhibitoren und Antikörper können in Arznei- und Diagnostikmitteln enthalten sein. Sie eignen sich insbesondere zur Behandlung oder Diagnose von Erkrankungen, die mit der Spaltung des Amyloid Precursor Proteins ursächlich verbunden sind, insbesondere der Alzheimerschen Erkrankung.

### **Beispiel 1:**

#### **$\gamma$ -Sekretase Assay**

Die putativen  $\gamma$ -Sekretasen werden stabil oder transient in cos-7 Zellen transfiziert, die zusätzlich SpA4CT (Signalpeptid fusioniert an BA4 gefolgt vom APP C-Terminus) stabil exprimieren.  $\gamma$ -Sekretase Aktivität ist in diesem System erkennbar durch die Generierung eines 4,6 KDa großen Peptides bzw. durch das Verschwinden der 11 KDa Bande des vollständigen SpA4CT. Bei Vorliegen der pathologisch relevanten  $\gamma$ -Sekretase sollten beide Fragmente im Inneren der Zelle zu detektieren sein. Im Überstand der Zellen ist immer BA4 zu finden, das durch eine endogene plasmamembran-ständige  $\gamma$ -Sekretase Aktivität generiert wird, die jedoch bei der Pathogenese von Alzheimer keine Rolle spielt.

Die transfizierten Zellen werden dreimal mit kaltem DMEM gewaschen und nachfolgend auf Eis mit einem Zellschaber geerntet. Die Zellen (ca.  $5 \times 10^6$  Zellen) werden durch Zentrifugation gesammelt und in 1 ml Lysis-Puffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1% NP-40, 1% Triton-x-100, 2 mM EDTA) lysiert. Die Kerne werden bei 11 000 g abzentrifugiert. Der Überstand wird einer Immunpräzipitation unterworfen. Hierzu werden 1 ml des Zelllysates mit 2 µg/ml WO2 Immunglobulin (anti-BA4 Antikörper ) versetzt und 0,5 h bei 4°C über Kopf geschüttelt. Nachfolgend werden 20 µl Protein-G Sepharose Suspension (1:1) hinzugeben und 5 h bei 4°C über Kopf geschüttelt. Die Protein-G Sepharose wird konsekutiv je zwei mal mit den Puffern A, B und C (A: 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.2% NP-40, 2 mM EDTA; B: 500 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.2% NP-40, 2 mM EDTA; C: 10 mM Tris-HCl pH 7.5) gewaschen, mit 20 µl 3X Probenpuffer versetzt, auf 95°C erhitzt und der Überstand auf ein 12% Tris-Tricine Gel aufgetragen. Nach der gelelektrophoretischen Größenfraktionierung werden die Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert und nachfolgend mit einem anti-BA4 Antikörper nachgewiesen.

### **Beispiel 2:**

#### **Identifizierung eines $\gamma$ -Sekretase Inhibitors**

Zur Identifizierung eines Inhibitors der pathologisch relevanten  $\gamma$ -Sekretase wird das Enzym nach der obigen Vorschrift in cos-7 Zellen mit SpA4CT coexprimiert. Die Zellen werden in geeigneter Weise mit der zu untersuchenden Substanz in Kontakt gebracht (in Gegenwart oder Abwesenheit von membran-permeabilisierenden Agentien). Anschließend wird das intrazellulär gebildete BA4 wie oben beschrieben nachgewiesen. Eine Verringerung der gebildeten Menge BA4 lässt auf eine Wirksamkeit der Substanz als  $\gamma$ -Sekretase Inhibitor schließen.



**Patentansprüche**

1. Protease mit zwei Aspartatresten in einer katalytisch aktiven Struktur, wobei ein erster Aspartatrest in einem Motiv  $X_1GX_2GD$  liegt und ein zweiter Aspartatrest in einem Motiv  $X_3X_4DX_5$  liegt, wobei  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$  und  $X_5$  unabhängig voneinander ausgewählt werden aus Ala, Val, Leu, Met und Ile und  $X_4$  eine aromatische Aminosäure ist, und die Motive  $X_1GX_2GD$  und  $X_3X_4DX_5$  in einer Transmembranregion liegen.
2. Protease nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Protease die Sequenz  $PALX_6YX_7V$  aufweist, wobei  $X_6$  und  $X_7$  unabhängig voneinander die gleiche Bedeutung haben wie  $X_1$  und bevorzugt Leu oder Ile sind.
3. Protease nach einem der Ansprüche 1 bis 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Protease eine der Sequenzen SEQ ID No. 1 - 8 und 18, 19 aufweist.
4. Nucleinsäuren kodierend für eine Protease nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3, bevorzugt mit der SEQ ID No. 9 - 17 oder 20.
5. Inhibitoren, dadurch gekennzeichnet, dass sie die Expression oder Aktivität der Protease nach einem der Ansprüche 1 bis 3 hemmen.
6. Antikörper, gerichtet gegen Proteasen nach einem der Ansprüche 1 bis 3.
7. Verfahren zur Identifizierung von Inhibitoren, dadurch gekennzeichnet, dass die Aktivität der Proteasen nach einem der Ansprüche 1 bis 3 in Gegenwart von potentiellen Inhibitoren gemessen wird.

8. Arzneimittel oder Diagnostikmittel enthaltend eine Protease nach einem der Ansprüche 1 bis 3, eine Nucleinsäure nach Anspruch 4, einen Inhibitor nach Anspruch 5 und/oder einen Antikörper nach Anspruch 6.
9. Verwendung des Arzneimittels oder Diagnostikmittels nach Anspruch 8 zur Diagnose oder Behandlung von Erkrankungen, die mit der Spaltung des Amyloid Precursor Proteins ursächlich verbunden sind, insbesondere der Alzheimerschen Erkrankung.
10. Verwendung des Arzneimittels oder Diagnostikmittels nach Anspruch 8 zur Diagnose oder Behandlung von Erkrankungen, die mit einem gestörten Abbau von hydrophoben Signalpeptiden ursächlich verbunden sind.
11. Verwendung des Arzneimittels oder Diagnostikmittels nach Anspruch 8 zur Diagnose oder Behandlung von Erkrankungen, die ursächlich mit der Akkumulation von ungefalteten Proteinen im Endoplasmatischen Retikulum verbunden sind.
12. Verwendung des Arzneimittels nach Anspruch 8 zur Beeinflussung der Präsentation von hydrophoben Peptiden durch Histokompatibilitäts-Komplex Moleküle bei Zuständen wie virale Infektion, Krebs oder einer Abstoßungsreaktion nach Transplantation.
13. Zell-Linie, dadurch gekennzeichnet, dass die Zell-Linie keine Protease gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3 exprimiert und/oder keine Nukleinsäure nach Anspruch 4 enthält.